

Expression of Recombinant Human Ferritin for Treatment of Iron Deficiency

강환구¹, 박형수¹, 이충열¹, 유병일¹, 유은정¹, 이 선¹, 황선덕¹, 이병욱²
한남대학교 화학공학과¹, 고신대학교²

Abstract

Ferritin, an iron-storage protein, is found in bacteria and some animal tissues such as liver, spleen, and bone marrow. It is more effective and causes less side reactions than the traditional ferrous sulfate, and thus has been used primarily to treat iron deficiency in pregnancy anaemia. Currently, the ferritin extracted from the bovine and equine spleens are sold as a commercial product. Its market is estimated as several hundreds of million US dollars. However, because of the recent warnings against the viral diseases of animal origins such as mad cow disease, a safer ferritin is sought after. Our research team has successfully developed a production process for recombinant human ferritin. Its expression titer from yeast is high enough to be economically viable, and its particle formation characteristics are as effective as well.

서 론

헤리틴은 체내에 존재하는 잉여의 철분(iron)을 보관하는 기능을 갖는 단백질 분자로서 세균을 비롯하여 식물계와 동물계에 널리 존재하고 있으므로 생명현상의 영위에 필수적인 물질로 생각되고 있다. 따라서 이번 실험은 인간 헤리틴 유전자 발현을 위한 형질전환된 재조합 효모균주 및 이를 이용한 재조합 인간 헤리틴 생산방법에 관한 것으로 인간 헤리틴 H-형태와 L-형태를 암호화하는 유전자가 각각 도입된 재조합 벡터 pYERH-1과 pYERL-1에 의해 형질전환된 재조합 효모균주를 배양하여 체내 철분 보존 기능을 담당하는 재조합 인간 헤리틴 발현에 관한 실험을 수행하였다.

방법 및 결과

본 연구는 인간 헤리틴을 구성하는 H-형태, L-형태와 H-L-형태의 발현 유전자를 인간의 간 cDNA 라이브러리에서 중합연쇄반응에 의해 클로닝하고 이렇게 클로닝된 유전자가 인간 헤리틴 H-형태 유전자임을 자동 염기서열 분석기에 의해 확인한 후 이 클로닝된 유전자가 도입된 재조합 발현벡터 pYERH-1을 제조하여 재조합 발현벡터 pYERH-1을 *Saccharomyces cerevisiae*에 Y2805WT에 형질전환시켜 재조합

효모균주 *S.cerevisiae*에 Y2805WT pYERH-1을 제조하는 단계; 상기 재조합 효모균주 *S.cerevisiae*에 Y2805WT pYERH-1을 배양하여 재조합 효모균주내 유전자를 발현시켜 재조합 인간 웨리틴 H-형태를 생산하는 단계; 인간 웨리틴을 구성하는 L-형태의 발현 유전자를 인간 간 cDNA 라이브러리에서 중합연쇄반응에 의해 클로닝하고 상기 클로닝된 유전자가 인간 웨리틴 L-형태 유전자임을 자동 염기서열 분석기에 의해 확인한 후 이 클로닝된 유전자가 도입된 재조합 발현벡터 pYERL-1을 제조하는 단계; 상기 재조합 발현벡터 pYERL-1을 *S.cerevisiae*에 Y2805WT에 형질전환시켜 재조합 효모균주 *S.cerevisiae*에 Y2805WT pYERL-1을 제조하는 단계; 및 상기 재조합 효모균주 *S.cerevisiae*에 Y2805WT pYERL-1을 배양하여 재조합 효모균주내 유전자를 발현시켜 L-형태 재조합 인간 웨리틴을 생산하는 단계로 구성된다. 균주 배양조건은 유전자가 도입된 균주를 URA⁻ 최소배지(w/o Nitrogenbase 0.67%, Glucose 2%, Histidine 20 μ g/ml)에서 O.D. 0.5(at 660nm)까지 자라게 한 형질전환 균주를 50배 희석하여 YPD(Yeast extract 2%, Peptone2%, Glucose 2%) broth 배지로 계대 배양하였다. 배양액의 OD₆₆₀이 6~7에 대수성장기까지(약 20시간)배양 후에 균주를 수거하였다. 수거된 균주를 원심분리하여 얻은 후 SDS가 포함된 버퍼를 전체 양에 1/2 (v/v)로 넣어 5분간 끓인 후 마커(Marker)와 함께 15% 폴리아크릴라마이드젤 SDS-PAGE (15% Tris-Glycine gel, Novex)로 전기영동하여 실버(Silver) 염색을 한 후 확인하였다. 또한 인간유래 Human ferritin H chain과 L chain을 강력한 Methylophilic Yeast로 알려진 *Hansenula polymorpha* A16과 *Pichia pastoris* GS115에 형질전환하였다. *Hansenula polymorpha* A16의 경우 MOX(Methanol oxydase) promoter를 사용하여 Human ferritin H chain 과 L chain, H와 L chain이 같이 결합된 유전자를 1M sobitol buffer 상에서 냉각세척방법으로 만들어진 competent cell에 Electroporater (Bio-rad Gene Pulser II)용 2mm 간극을 가진 큐벳(Cuvette)에 DNA와 넣고 200 Ω , 250V, 1.5 μ F 조건에서 전기 속(shock)을 주어 cDNA와의 duplication을 유도하였고 zeocin 항생 marker를 이용한 선택배지에서 균주선택을 하였다. 얻어진 균주는 YMG(YE 1%, Glycerol 2%, Methanol 8g/L)에서 48시간 발현시킨 뒤 Bead-better로 cell을 destruction 한 뒤 SDS-PAGE 방법으로 detection 하여 ferritin 발현유무 및 발현양을 관찰하였다. *Pichia pastoris* GS115의 경우 pPICZ vector를 사용하여 (zeo r, from invitro gene inc.) AOX(Alcohol oxydase) promoter와 Human ferritin H chain, L chain을 construction 하여 상기에 기술한 *H. polymorpha* A16와 같은 competent cell 제조 및 Electroporation 조건으로 형질전환한 뒤 zeocin 항생배지에서 자라는 균주를 선택하여 YMG 배지에서 48시간 배양하고, *H. polymorpha* A16과 같은 방법으로 cell을 파쇄하여 SDS-PAGE 방법으로 detection 하여 비형질체와 비교 발현유무와 발현양을 확인하였다.

이 결과 중 Fig. 2에서 *S. cerevisiae*에 의한 H-L형태의 인간훼리틴 발현양상이 보여진다.

결론 및 고찰

인간 훼리틴이 *Sacchromyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris* and *Escherichia coli*에서 H, L 또한 H&L-형태로 성공적으로 발현되었다. 이러한 인간 훼리틴 생성을 최적화하기 위해 훼리틴 발현의 최적화와scale-up공정 개발이 진행중에 있다.

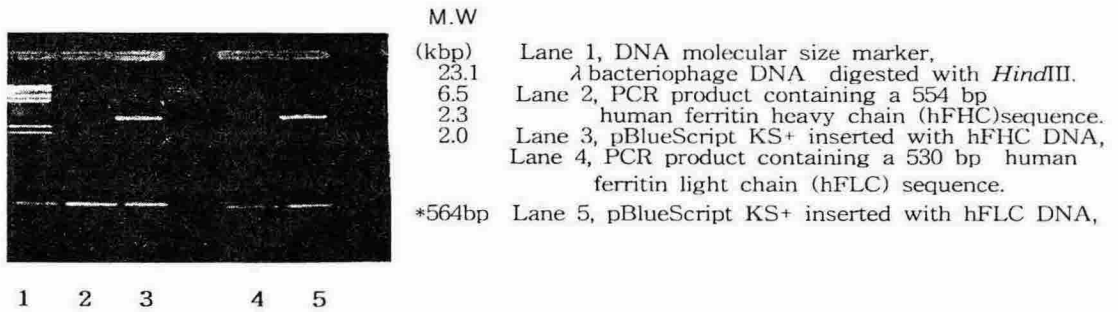
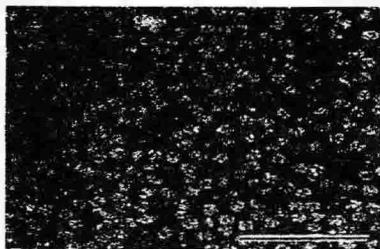
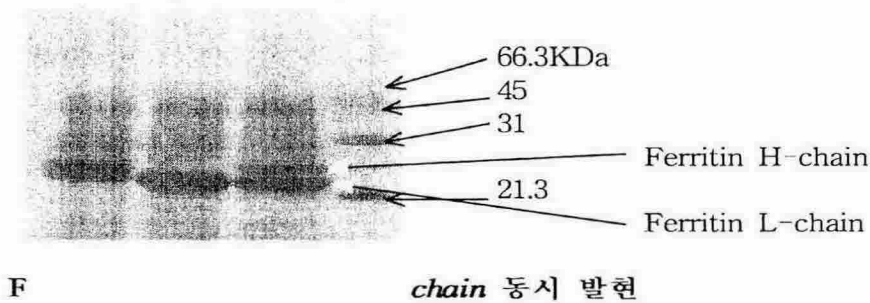


Fig. 1 Agarose gel Electrophoresis for Human Ferritin H- & L-chain



19nm ferritin particales can be seen in a photograph

The scale bar represents 100nm

Fig. 3 Electron microscopy for Ferritin particle expressed in Yeast

참고문헌

1. Klausner, R. D., Rouault, T. A. and Harford, J. B. (1993) *Cell* 72, 19-28
2. Hentze, M. W. and Kuhn, L. C. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 8175-8182
3. Harrison, P. M. and Arosio, P. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* 1275, 161-163
4. Lawson, D. M., Artymiuk, P. J., Yewdall, S. J., Livingstone, J. C., Treffry, A., Luzzago, A., Levi, S., Arosio, P., Cesareni, G., Thomas, C. D., Shaw, W. and Harrison, P. M. (1991) *Nature (London)* 349, 541-544
5. Levi, S., Luzzago, A., Cesareni, G., Cozzi, A., Franceschinelli, F., Albertini, A. and Arosio, P. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 18086-18092
6. Levi, S., Santambrogio, P., Cozzi, A., Rovida, E., Corsi, B., Tamborini, E., Spada, S., Albertini, A. and Arosio, P. (1994) *J. Mol. Biol.* 238, 649-654
7. Levi, S., Santambrogio, P., Corsi, B., Cozzi, C. and Arosio, P. (1996) *Biochem. J.* 317, 467-473
8. Treffry, A., Zhao, Z., Quail, M. A., Guest, J. R. and Harrison, P. M. (1995) *Biochemistry* 34, 15204-15213
9. Sun, S. J., Arosio, P., Levi, S. and Chasteen, N. D. (1993) *Biochemistry* 32, 9362-9369
10. Santambrogio, P., Levi, S., Cozzi, A., Rovida, E., Albertini, A. and Arosio, P. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 12744-12748